



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
A-1200 Wien, Dresdner Straße 87



Kanzleigebühr € 26,00
Schriftengebühr € 104,00

Aktenzeichen **A 1622/2003**

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

**die Firma SANDOZ GmbH
in A-6250 Kundl/Tirol, Biochemiestraße 10
(Tirol),**

am **15. Oktober 2003** eine Patentanmeldung betreffend

"Organische Verbindungen",

überreicht hat und dass die beigeheftete Beschreibung mit der ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten Beschreibung übereinstimmt.

Österreichisches Patentamt
Wien, am 24. August 2004

Der Präsident:

i. A.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



HRNCIR
Fachoberinspektor

BEST AVAILABLE COPY





AT PATENTSCHRIFT

(11) Nr.

(Bei der Anmeldung sind nur die eingerahmten Felder auszufüllen - bitte fett umrandete Felder unbedingt ausfüllen!)

(73) Patentinhaber (bzw. -inhaber):

Sandoz GmbH
Biochemiestrasse 10
A-6250 Kundl/Tirol

(54) Titel der Anmeldung:

Organische Verbindungen

(61) Zusatz zu Patent Nr.

(66) Umwandlung von GM /

(62) gesonderte Anmeldung aus (Teilung): A /

(30) Priorität(en):

(72) Erfinder:

(22) (21) Anmeldetag, Aktenzeichen:

2003-10-15 , A /

(60) Abhängigkeit:

(42) Beginn der Patentdauer:

Längste mögliche Dauer:

(45) Ausgabetag:

(56) Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht gezogen wurden:

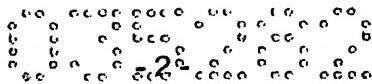
Organische Verbindungen

Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäure-Moleküle, die für ein neues Protein aus *Penicillium chrysogenum* kodieren, Vektoren, die ein solches Nukleinsäure-Molekül umfassen, Wirtszellen, die mit einem solchen Nukleinsäure-Molekül oder Vektor transformiert sind, und ein Verfahren zur Herstellung von Penicillin unter Verwendung solcher transformierter Zellen.

Hintergrund der Erfindung

Penicillin ist ein natürlicher Metabolit, der durch Fermentation des filamentösen Pilzes Penicillium chrysogenum (im folgenden als P. chrysogenum bezeichnet) in industriellem Massstab gewonnen wird. Penicillin G und Penicillin V bilden darüber hinaus wichtige Vorstufen für eine Reihe halb-synthetischer Penicillin-Antibiotika. Die Substanzklasse der Penicilline ist von grosser therapeutischer Bedeutung. Ausbeutesteigerungen der industriellen Penicillin-Fermentation beruhen nebst verfahrenstechnologischen Verbesserungen im wesentlichen auf einer kontinuierlichen genetischen Stammverbesserung. Im Vordergrund moderner Methoden dieser Stammverbesserung steht immer mehr die Transformation von Produktionsstämmen mit spezifischen Genen, welche ein Potential zur Produktionssteigerung aufweisen. Für eine kleine Gruppe von bekannten Penicillin-Biosynthesegenen kann über das Verständnis biochemischer Zusammenhänge der Penicillin-Biosynthese ein Stammverbesserungs-Potential vermutet werden. Amplifikation, d.h. Erhöhung der Kopienzahl von solchen bekannten Genen, zeigt im Experiment teilweise tatsächlich eine signifikante Verbesserung der Produktivität eines Produktionsorganismus. Die Gruppe von bekannten Genen, für welche aus wissenschaftlichen Plausibilitätsüberlegungen heraus ein Stammverbesserungspotential vorhergesagt werden kann, ist allerdings sehr klein. Nebst diesen bekannten Biosynthesegenen kann aber eine unbekannte Zahl weiterer Gene vermutet werden, welche durch Amplifikation ebenfalls ein produktionssteigerndes Potential bewirken. Die Funktion solcher Gene ist häufig nicht bekannt, da die Gesamtheit der zellulären Prozesse mit Einfluss auf die Penicillin-Biosynthese zur Zeit noch sehr wenig verstanden wird. Strategien

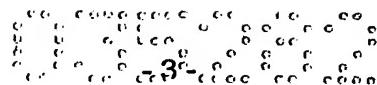


zur Identifikation weiterer Gene mit produktionssteigerndem Potential sind daher von grosser Bedeutung.

Die wichtigen Penicillin-Biosynthesegene, ACV-Synthetase (ACVS), Isopenicillin-N (IPN) Synthase und die Acyl CoA : IPN Acyltransferase sind bereits seit längerem bekannt. Zentrales Enzym ist die ACVS, eine Nicht-ribosomale Peptidsynthetase (NRPS), welche die Bildung des Tripeptids ACV katalysiert. Erst in den letzten Jahren wurde bei einigen Mikroorganismen bekannt, dass NRPS mit Phosphopantethein „beladen“ werden müssen, um in eine aktive Form gebracht zu werden.

4'-Phosphopantetheintransferasen (PPTasen) katalysieren den Transfer der 4'-Phosphopantetheingruppe (P pant) aus Coenzyme A (CoASH) auf die Hydroxylfunktion der Seitenkette eines konservierten Serinrestes, welches sich in P pant-abhängigen Carrier-Proteinen befindet. Das Carrier-Protein, allgemein XCP abgekürzt, wird dabei von der katalytisch inaktiven apo-Form in die katalytisch aktive holo-Form konvertiert. Die Reaktion ist Mg²⁺-abhängig und bildet 3'-5'-ADP als Nebenprodukt. Es gibt verschiedene P pant-abhängige Biosynthesewege. In jeder Zelle findet man die Fettsäurebiosynthese, in der das Acyl-carrier Protein (ACP) die Intermediate bindet. Viele Antibiotika und Naturstoffe, wie z.B. Cyclosporin und die β-Lactame, werden durch nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) oder Polyketidsynthetasen (PKS) produziert, die Peptidyl-carrier Proteine (PCP) beziehungsweise ACP enthalten. Schließlich ist eine spezialisierte Peptidsynthetase in einer zu Lysin führenden Biosyntheseroute in Pilzen und einigen Pflanzen anzutreffen. Allen diesen Biosynthesewegen ist gemeinsam, daß die beteiligten Carrier-Proteine von PPTasen phosphopantetheinyliert und damit in die aktive Form überführt werden. Die PPTasen sind essentielle Faktoren für diese Prozesse, allerdings sind die für sie kodierenden Gene in vielen Fällen noch unbekannt. In *P. chrysogenum* ist eine solche PPTase bzw. das entsprechende Gen bisher nicht beschrieben worden.

Das Auffinden eines solchen, bisher unbekannten Gens aus *P. chrysogenum*, das für eine PPTase kodiert, bildet somit eine zentrale Aufgabe der vorliegenden Erfindung. Es ist somit eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Nukleinsäure sowie Vektoren bereitzustellen, die für neues Protein aus *P. chrysogenum* kodieren und zur Transformation einer *P. chrysogenum* Wirtszelle verwendet werden können, so dass diese Wirtszelle in der Lage ist, Penicillin in guten Ausbeuten zu liefern. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist



die Bereitstellung einer solchen transformierten Wirtszelle. Schliesslich ist es eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung von Penicillin unter Verwendung der genannten transformierten Wirtszelle bereitzustellen.

Figuren

Fig. 1 zeigt die Aminosäuresequenz (SEQ ID NR 1 = Sequenz-Identitäts-Nr. 1) eines neuen Proteins aus *P. chrysogenum*, die aus dem erfindungsgemässen Nukleinsäuren-Molekül (Nukleinsäurensequenz gemäss Fig.2 bzw. 4) hergeleitet wird. Die Darstellung erfolgt von N-Terminus zum C-Terminus.

Fig. 2 (SEQ ID NR 2) zeigt die genomische DNA-Sequenz einschliesslich des 1 Introns des kodierenden Bereichs des pptA Gens aus *P. chrysogenum* vom Translations-Start-Codon (ATG) bis zum Translations-Stopp Codon (TAA). Das Intron ist unterstrichen, dargestellt ist ein Einzelstrang von 5'- in 3'-Richtung.

Fig. 3 (SEQ ID NR 3) zeigt die cDNA-Sequenz des kodierenden Bereichs des neuen Gens vom Translations-Start-Codon (ATG) bis zum Translations-Stopp Codon (TAA); dargestellt ist ein Einzelstrang von 5'- in 3'-Richtung.

Fig. 4 (SEQ ID NR 4) zeigt die genomische DNA-Sequenz eines Sall-Fragments eines genomischen Klons des neuen Gens (dargestellt ist ein Einzelstrang von 5'- in 3'-Richtung). Das Translations-Start-Codon (ATG) sowie das Translations-Stopp-Codon (TAA) des kodierenden Bereichs sind unterstrichen und fettgedruckt dargestellt; das Intron ist unterstrichen dargestellt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird ein neues Gen aus *P. chrysogenum* beschrieben, das für ein bisher unbekanntes Protein in *P. chrysogenum* kodiert. Es wird gezeigt, dass es sich dabei um eine neue PPTase handelt, und dass aus Co-Transformationsexperimenten mit diesem Gen Stämme mit für industrielle Massstäbe hohen Penicillin-Titern hervorgehen können.

4

Das neue Gen kann aus dem *P. chrysogenum* Stamm P2 = ATCC 48271 (erhältlich unter dieser Nummer von ATCC, American Type Culture Collection, Postfach 1549, Manassas, VA 20108, USA) isoliert werden. Das neue Gen ist jedoch auch in anderen *P. chrysogenum*-Stämmen auffindbar. Alternativ sind die hier vorgestellten Nukleinsäure- und Aminosäure-Sequenzen bzw. -Moleküle synthetisch herstellbar.

Das Gen kodiert für ein Protein mit einer Länge von 411 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz ist in Figur 1 dargestellt. Der kodierende Bereich ist im Gen von 1 Intron unterbrochen, wie in Figuren 2 und 4 ersichtlich ist.

Aufgrund funktioneller Tests (siehe Beispiel 2) wird das erfindungsgemäße Gen aus *P. chrysogenum* als Gen für eine bisher unbekannte PPTase charakterisiert und als *pptA* Gen bezeichnet.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein isoliertes Nukleinsäure-Moleköl, das für ein Protein kodiert, das die Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NR 1 umfasst.

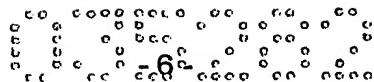
Ein solches Nukleinsäure-Molekül kann somit beispielsweise für ein Protein kodieren, das neben der ausgeführten Aminosäuresequenz (SEQ ID NR 1) noch weitere Aminosäuren enthält, beispielsweise für ein Fusionsprotein. Solche Fusionsproteine können beispielsweise eine Rolle spielen, wenn gewünscht ist, das neue Protein isoliert herzustellen. Die Fusionsanteile können beispielsweise die Stabilität erhöhen oder die Aufreinigung erleichtern.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt ist ein erfindungsgemässes Nukleinsäure-Molekül, das nur für eine Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NR 1 kodiert. Ein solches Nukleinsäure-Molekül ist vorteilhaft zum Zwecke der im Weiteren beschriebenen Produktion von Penicillinen, insbesondere von Penicillin V oder G einsetzbar. Somit ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein erfindungsgemässes Nukleinsäure-Molekül, das für ein Protein kodiert, das ausschliesslich die Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NR 1 aufweist.

Bevorzugterweise handelt es sich beim einem erfundungsgemässen Nukleinsäure-Molekül um ein DNA-Molekül. Alternativ kann es sich bei dem Nukleinsäure-Molekül um ein RNA-Molekül, insbesondere um ein mRNA-Molekül handeln.

Ein erfindungsgemässes DNA-Molekül kann beispielsweise hergestellt werden, indem eine genomische DNA-Bioibliotheke des Genoms des genannten *P. chrysogenum* Stammes ATCC48271 erzeugt wird. Man identifiziert einen genomischen Klon durch "Screening" mit homologen Sonden, deren Strukturen aus der beschriebenen Nukleinsäure-Sequenz des Gens gemäss Fig. 4 herleitbar sind. Entsprechende Techniken sind aus der Literatur bekannt (so z.B. in T. Maniatis et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA). Das gesuchte DNA-Molekül befindet sich auf einem etwa 3.2 kb grossen Sall-Fragment eines solchen Klons, das mit klassischen Techniken isoliert oder hergestellt werden kann. Ein solches Fragment ist in Fig. 4 dargestellt. Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft somit ein erfindungsgemässes Nukleinsäure-Molekül, umfassend eine Basensequenz gemäss SEQ ID NR 4 oder eine Basensequenz, die sich nur aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz gemäss SEQ ID NO. 4 unterscheidet. D.h., erfindungsgemäss sind auch solche Nukleinsäure-Moleküle Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die sich von den spezifisch aufgeführten Sequenzen dadurch unterscheiden, dass eines oder mehrere der aufgeführten Codons durch ein anderes oder mehrere andere derart ersetzt werden, dass sich die Aminosäuresequenz des kodierten Proteins (SEQ ID NR 1) nicht ändert. Dies schliesst die Verwendung eines (oder mehrerer) alternativen Stopp-Kodons mit ein. Dies gilt auch für die weiteren, im folgenden beschriebenen Nukleinsäure-Moleküle. Das Nukleinsäure-Molekül gemäss SEQ ID NR 4 enthält regulatorische Sequenzen (wie einen Promotor und ein Stopp-Codon) und kann vorteilhaft zur Transformation, insbesondere in einem Vektor, von *P. chrysogenum* und damit zur Produktion von Penicillin, insbesondere von Penicillin G oder Penicillin V, eingesetzt werden.

Das genannte etwa 3.2 kb grosse Sall-Fragment umfasst insbesondere den kodierenden Teil des neuen Gens. Dieser Teil ist in Fig. 2 dargestellt und umfasst 1 Intron. Somit ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung eine erfindungsgemässes Nukleinsäure-Molekül umfassend eine Basensequenz gemäss SEQ ID NR 2 oder eine Basensequenz, die sich nur aufgrund der Degeneration des genetischen Codes, wie oben erläutert, von der Sequenz gemäss SEQ ID NO. 2 unterscheidet. Ein solches Nukleinsäure-Molekül entspricht



somit der genomischen DNA-Sequenz des kodierenden Teils des neuen Gens. Weitere bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind solche Nukleinsäure-Moleküle, die sich von dem der SEQ ID NR 2 durch das Fehlen des einen Introns unterscheiden.

Weiterhin bevorzugt ist somit ein erfindungsgemässes Nukleinsäure-Molekül umfassend eine Basensequenz gemäss SEQ ID NR 3 oder eine Basensequenz, die sich aufgrund der Degeneration des genetischen Codes, wie oben erläutert, von der Sequenz gemäss SEQ ID NO. 3 unterscheidet. Eine solches Nukleinsäure-Molekül umfasst kein Intron mehr und ist als solches einer entsprechenden cDNA Sequenz gleichzusetzen.

Weiterhin kann die Herstellung eines erfindungsgemässen Nukleinsäure-Moleküls (einschliesslich eines genannten cDNA-Moleküls) beispielsweise vollsynthetisch oder teilsynthetisch erfolgen. Erfindungsgemässse RNA- bzw. mRNA-Moleküle sind mittels Standardtechniken aus dem Mikroorganismus *P. chrysogenum* isolierbar oder synthetisch herstellbar. Es ist möglich, aus einer entsprechenden mRNA mit Standardtechniken ein entsprechendes cDNA-Molekül herzustellen.

Während die genannten Nukleinsäure-Moleküle durchaus weitere Basensequenzen enthalten können (um z.B. für ein Fusionsprotein zu kodieren), betreffen bevorzugte Ausführungsformen ein erfindungsgemässes Nukleinsäure-Molekül, das ausschliesslich eine Basensequenz aufweist, die ausgewählt ist aus der Gruppe der Basensequenzen SEQ ID NR 2, SEQ ID NR 3, SEQ ID NR 4 und einer Basensequenz, die sich nur aufgrund der Degeneration des genetischen Codes, wie oben erläutert, von einer der genannten Sequenzen unterscheidet.

In einer weiteren Ausführungsform umfassen erfindungsgemässse Nukleinsäure-Moleküle an ihrem C-Terminus unmittelbar nach dem Ende der kodierenden Region zusätzlich ein oder mehrere Stopp-Codons(s). Bevorzugt ist das natürlich vorkommende Stopp-Codon, das als TAA identifiziert wurde. Alternativ sind jedoch auch die anderen bekannten Stopp-Codons einsetzbar. Auch der Einsatz von mehreren Stopp-Kodons ist möglich.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, der eines der erwähnten erfindungsgemässen Nukleinsäure-Moleküle umfasst. Bevorzugt ist ein solcher

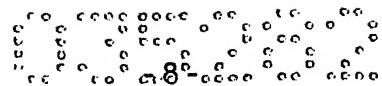
78

Vektor zur Transformation einer Wirtszelle geeignet. Insbesondere handelt es sich bei einer solchen Wirtszelle um einen Mikroorganismus. Bevorzugt ist ein solcher Mikroorganismus ein filamentöser Pilz. Vorteilhafterweise ist der filamentöse Pilz ausgewählt aus der Gruppe, die aus *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium citrinum*, *Acremonium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* und *Tolypocladium inflatum* besteht. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Mikroorganismus bzw. der filamentöse Pilz *Penicillium chrysogenum*.

Ein solcher Vektor kann beispielsweise in Form eines Plasmids vorliegen. Ein solcher Vektor enthält, wo notwendig, neben einem erfindungsgemässen Nukleinsäure-Molekül weitere Sequenzen, z. B. einen Replikationsursprung und weitere regulatorische Elemente (Promotor, Translations-Start bzw. -Terminationssignal usw.), so dass nach erfolgter Transformation eine Expression des erfindungsgemässen Nukleinsäure-Moleküls erfolgen kann. Nach erfolgter Transformation kann eine Integration eines erfindungsgemässen Nukleinsäure-Moleküls sowie weiterer Vektorelemente in das Genom der Wirtszelle erfolgen, was einer Amplifikation des kodierenden Teils des neuen Gens entspricht. Vorteilhafterweise umfasst ein erfindungsgemässer Vektor ein Nukleinsäure-Molekül, das eine Basensequenz gemäss SEQ ID NR 4 umfasst. Eine solche Basensequenz entspricht dem genannten Sall-Fragment und umfasst bereits regulatorische Sequenzen, wie beispielsweise einen entsprechenden Promotor.

Solche Vektoren können nach Standard-Techniken durch Einklonieren eines erfindungsgemässen Nukleinsäure-Moleküls in geeignete Standard-Vektoren erzeugt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft eine Wirtszelle, die mit einem erfindungsgemässen Nukleinsäure-Molekül oder mit einem erfindungsgemässen Vektor transformiert ist. Insbesondere handelt es sich bei einer solchen Wirtszelle um einen Mikroorganismus. Bevorzugt ist ein solcher Mikroorganismus ein filamentöser Pilz. Vorteilhafterweise ist der filamentöse Pilz ausgewählt aus der Gruppe, die aus *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium citrinum*, *Acremonium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* und *Tolypocladium inflatum* besteht. In einer besonders bevorzugten



Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Wirtszelle (bzw. der Mikroorganismus bzw. der filamentöse Pilz) *Penicillium chrysogenum*.

Die Transformation einer solchen Wirtszellen, insbesondere von *P. chrysogenum*, mit einem erfindungsgemässen Vektor erfolgt nach Standardverfahren. Ein solches Verfahren ist beispielsweise beschrieben in der Österreichischen Patentschrift AT 391 481, Beispiele 6, 8, 10 und 12.

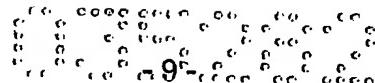
Alternativ dazu kann auch eine sogenannte Co-Transformation durchgeführt werden. Dabei werden der Vektor mit einem Selektionsmarker und der Vektor mit dem erfindungsgemäßen Gen als getrennte Moleküle bei der Transformation eingesetzt.

Alternativ dazu wiederum können auch die erfindungsgemässen Nukleinsäure-Moleküle zur Transformation eingesetzt werden.

Insbesondere können somit die einzubringenden Gene selbst (das erfindungsgemässe Gen und wenigstens ein Markergen), etwa als lineare Nukleinsäure-Moleküle, getrennt eingesetzt werden. Ein gewisser Anteil an transformierten Wirtszellen, welche den zu selektionierenden Vektor, bzw. das entsprechende Selektionsgen tragen, enthält dann auch das zweite in einer solchen Co-Transformation eingesetzte Gen. Der Anteil ist abhängig vom einzelnen Experiment und den gewählten praktischen Versuchsparametern.

Eine erfindungsgemässe, transformierte *P. chrysogenum* - Wirtszelle kann vorteilhaft zur Herstellung von Penicillin verwendet werden. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung von Penicillin, umfassend die Kultivierung einer erfindungsgemässen *P. chrysogenum* - Wirtszelle unter Bedingungen, die geeignet sind, die Bildung von Penicillin durch die Wirtszelle zu bewirken. Besonders bevorzugt ist das Penicillin ausgewählt aus der Gruppe, die aus Penicillin G und Penicillin V besteht.

Geeignete Kultivierungs-/Fermentationstechniken sind dem Fachmann auf dem Antibiotika-Gebiet bekannt und werden seit langem bei der Herstellung von Penicillinen eingesetzt.



In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße Verfahren weiterhin die Isolierung des gebildeten Penicillins. Das von einer erfindungsgemäßen, transformierten *P. chrysogenum*-Wirtszelle gebildete Penicillin kann aus dem fermentierten Mycel-Brei durch bekannte Techniken, beispielsweise Extraktion mit Butylacetat und anschließender chromatographischer Techniken, aufgereinigt bzw. isoliert werden.

Erfindungsgemäß erzeugtes Penicillin, insbesondere Penicillin G oder Penicillin V, kann vorzugsweise zu weiteren Derivaten mit antibiotischen Eigenschaften umgesetzt werden.

Eine alternative Anwendung der vorliegenden Erfindung betrifft ein isoliertes Protein, das eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NR 1 umfasst. Wie erwähnt, umfasst ein solches Protein auch entsprechende Fusionsproteine, aus denen, wo gewünscht, durch Abspaltung ein reifes Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NR 1 erzeugt werden kann. Bevorzugt ist ein erfindungsgemässes Protein, wobei das Protein ausschliesslich die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NR 1 aufweist.

Ein erfindungsgemässes Protein kann dadurch hergestellt werden, dass eine geeignete prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle, die einen erfindungsgemässen, geeigneten Expressionsvektor enthält, der ein für das Protein kodierendes Nukleinsäure-Molekül umfasst, unter Bedingungen kultiviert wird, die eine Expression des Proteins bewirken. Das Protein kann mit üblichen Techniken aufgereinigt und isoliert werden. Geeignete prokaryontische Wirtszellen, bei denen insbesondere eine erfindungsgemäss cDNA eingesetzt wird, sind beispielsweise bakterielle Zellen, z.B. *E. coli*; geeignete eukaryontische Wirtszellen sind beispielsweise Hefe-Zellen, wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris*, oder Säuger-Zellen, wie z.B. CHO- oder BHK-Zellen.

Ein erfindungsgemässes Protein kann beispielsweise verwendet werden, um in vitro entsprechende Enzyme, wie NRPS oder PKS, bzw. einzelne Modul- oder Domäneneinheiten davon, mit einer 4'-Phosphopantetheingruppe von der apo-Form in die enzymatisch aktive holo-Form zu bringen (siehe oben). Das erfindungsgemäße Protein stellt damit ein wertvolles Werkzeug dar, um aus Vertretern der genannten Enzymgruppen (wie NRPS oder PKS), aber auch aus anderen 4'-Phosphopantethein-enthaltenden Enzymen, bzw. einzelnen Teilen davon, aktive in-vitro Systeme zur Erzeugung neuer Moleküle herzustellen, etwa Systeme zur kombinatorischen Biosynthese.

10⁻¹

Auf die hierin erwähnten Referenzen wird hiermit vollinhaltlich Bezug genommen.

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert, sie ist jedoch nicht darauf beschränkt. Insbesondere betreffen die Beispiele bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung.

Beispiele

Die hierin erwähnten Materialen und Reagenzien sind dem Fachmann geläufig, im Handel erhältlich oder leicht zugänglich und können nach den Anweisungen der Hersteller verwendet werden.

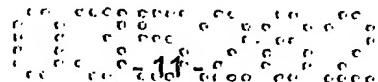
Beispiel 1: Isolierung des neuen Gens pptA aus Penicillium chrysogenum

Das erfindungsgemäße Gen wird mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion hergestellt. Dazu wird DNA aus dem Penicillium chrysogenum Stamm ATCC48271 isoliert. Dazu werden Zellen des Pilzes mechanisch in flüssigem Stickstoff durch Zerreiben in einer Reibschale aufgebrochen und anschließend mit Hilfe einer Standard-Technik, wie etwa beschrieben von T. Maniatis et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, bzw. mit einem kommerziell erhältlichen Kit, etwa von der Firma Qiagen, isoliert.

Mit Hilfe der Primer PCR1f und PCR1r wird unter standardmäßigen Bedingungen mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase ein ca. 3.2 kb großes Amplifikat aus der genomischen DNA hergestellt.

Primer PCR1f 5'- CCCC GTCGACCGAAGTGGTTCGGTTCACTCGCACAT
(SEQ ID NR 5)

Primer PCR1r 5'- CCCC GTCGACGCAGGATTCGATGCTAAACTCTTGC
(SEQ ID NR 6)



Für die Klonierung des amplifizierten Bereiches, welcher dem erfindungsgemässen Nukleinsäure-Moleküle gemäss SEQ ID NO 4 entspricht, wird das Fragment mit der Restriktionsendonuklease Sall geschnitten und in ein standardmäßig verwendetes E.coli-Plasmid über eine Sall-Stelle einligiert; ein solches standardmässiges Plasmid ist zum Beispiel pBluescript II SK+ (Fa. Stratagene).

Das Ligationsprodukt wird in E. coli (z.B. Stamm DH5alpha) eintransformiert und dort in einer für die weiteren Schritte ausreichenden Menge produziert und aufgereinigt. Bedingt durch den Konstruktionsweg, können auch Plasmide resultieren, die das Nukleinsäure-Molekül in umgedrehter Orientierung enthalten; diese Strukturen sind aber prinzipiell von gleicher Funktionalität.

Eine nachfolgende Sequenzierung und Auswertung ergibt die in den Figuren 2 (SEQ ID NR 2) und 4 (SEQ ID NR 4) dargestellten Nukleinsäuresequenzen. Eine cDNA-Sequenz gemäss Figur 3 (SEQ ID NR 3) lässt sich dann daraus ableiten, ebenso wie die Aminosäuresequenz des kodierten Proteins gemäss Figur 1 (SEQ ID NR 1). Grundsätzlich kann eine abschliessende Verifikation des Klonierungsproduktes durch Sequenzierung und einen Sequenzvergleich mit den in den Figuren 2 bzw. 4 dargestellten DNA-Sequenzen erfolgen. Ein Plasmid, das das Sall-Fragment trägt, wird als Plasmid1 bezeichnet und nachfolgend verwendet.

Beispiel 2: Funktionelle Charakterisierung des neuen Gens pptA aus Penicillium chrysogenum

Zur funktionellen Charakterisierung des neuen Gens wird die cDNA des neuen pptA Gens aus Penicillium chrysogenum wird mit Hilfe von PCR aus Gesamt-cDNA von P. chrysogenum amplifiziert. Die Gesamt-cDNA wird aus mRNA von P. chrysogenum mittels kommerziell erhältlicher Kits (z.B. von Qiagen) und Labor-Standardmethoden hergestellt.

Mit Hilfe der Primer PCR2f und PCR2r wird ein ca. 1,25 kb großes Amplifikat aus der cDNA hergestellt und in den Hefe-Vektor pYES2.1-Sfi eingebaut.

Primer PCR2f 5'- GGGGGCCGAGGCAGGCCATGGATAACCAATGATATCAAACAG (SEQ ID NR 7)

12

Primer PCR2r 5'- GGGGCCATTATGGCCTCATTAGGACTACCTGCCGCGAACG
(SEQ ID NR 6)

Der Vektor und die weitere Durchführung des funktionellen Tests ist in H.D. Mootz et al., "Functional characterization of 4'-phosphopantetheinyl transferase genes of bacterial and fungal origin by complementation of *Saccharomyces cerevisiae lys5*", FEMS Microbiol.Lett. 213 (2002), S. 51-57, detailliert beschrieben. Der im vorliegenden Beispiel für den funktionellen Test verwendete Hefe-Expressionsvektor wird analog zu pYES2-npgA (H.D. Motz et al., s.o., Kapitel 2.2, Seite 53) hergestellt.

Der Test beruht auf der funktionellen Komplementation eines bestimmten Defektes in einem Hefestamm. Das Lys5-Gen kodiert für eine PPTase, die essentiell ist, um die Aminosäure Lysin in der Hefezelle herzustellen und damit der Hefezelle ermöglicht, auf Minimalmedium ohne Lysin zu wachsen. Ein speziell konstruierter Hefestamm, in dem das Lys5-Gen zerstört wurde, kann nicht mehr Lysin herstellen. In diesen Hefestamm wird das erfindungsgemäße Gen, eingebaut in den oben erwähnten Hefe-Expressionsvektor, eintransformiert. Der Test ist in Kapitel 3, Seiten 54-55, der genannten Publikation von H.D. Mootz et al., s.o., detailliert beschrieben.

Entsprechende Hefe-Transformanten mit dem exprimierten pptA Gen aus *P.chrysogenum* können wieder auf dem Selektionsmedium (Minimalmedium ohne Lysin) wachsen, der lys5 Defekt wird komplementiert (siehe auch Kapitel 3.4, Seite 55 der genannten Publikation von H.D. Mootz et al.). Dadurch wird gezeigt, dass es sich beim pptA Gen aus *P. chrysogenum* um ein Gen für eine funktionelle 4'-Phophopantetheinyl-Transferase handelt.

Beispiel 3: Co-Transformation von *Penicillium chrysogenum*

Aus einer entsprechenden Menge (je nach Anzahl der durchzuführenden Transformationsansätze) an Plasmid1 wird das in Beispiel 1 beschriebene erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül durch Restriktion mit Sall und anschließender Reinigung des 3.2 kb Fragmentes über Agarosegel-Elektrophorese präpariert und zur Transformation bereitgestellt.

13

Als Selektionsmarker wird das niaD-Gen aus *P.chrysogenum* in Form eines Teilfragmentes des in der Österreichischen Patentschrift AT 391 481 beschriebenen Plasmids J-12 verwendet. Dazu wird Plasmid J-12 mit EcoRI geschnitten und das ca. 6.5 kb große Fragment, welches das niaD Fragment trägt, in das mit EcoRI linearisierte Plasmid pUCBM20 (Roche Diagnostics) eingesetzt. Daraus resultieren zwei mögliche Plasmide, die jeweils ca. 9.1 kb groß sind und die sich in der Orientierung des eingebauten EcoRI Fragmentes unterscheiden. Entsprechende Plasmide von Subklonen werden mit einem gemeinsamen Verdau der Enzyme XmaI und AgeI untersucht. Ein Klon mit der Orientierung, bei der ein ca. 2 kb großes und ein ca. 7.1 kb großes Fragment entsteht, wird ausgewählt und als p1649A bezeichnet. Das Plasmid p1649A wird mit XmaI und AgeI geschnitten und das ca. 7.1 kb große Fragment religiert, da XmaI und AgeI kompatible Enden besitzen. Plasmide aus entsprechenden *E.coli* Klonen werden durch Restriktion mit EcoRI geprüft und als p1649C bezeichnet.

Für die Transformation von *P.chrysogenum* Protoplasten der entsprechenden Stämme wird ein lineares Teilfragment des Plasmides p1649C verwendet, nämlich das ca. 4.5 kb große EcoRI/XbaI Fragment. Dies wird durch Restriktion mit den Enzymen EcoRI und XbaI und anschließender Präparation hergestellt. Das Fragment trägt das niaD Gen. Ebenso können natürlich die vollständigen Plasmide p1649C, p1649A oder J-12 entsprechend zur Transformation verwendet werden.

Als Empfängerstämme für eine Transformation können prinzipiell alle *P. chrysogenum* Stämme verwendet werden, für die ein geeignetes Selektionssystem zur Verfügung steht. Die beiden hergestellten Fragmente, die entsprechend das neue Gen bzw. den niaD Marker enthalten, werden in einen *P. chrysogenum* Stamm (PC-180060), der als niaD Mutante charakterisiert wird, mittels einer Standardprozedur für Protoplastentransformation eintransformiert. Alternativ wird ein käuflich erhältlicher *P. chrysogenum* Stamm wie ATCC48271 (als *P. chrysogenum* Stamm P2 bezeichnet) zur Transformation verwendet.

Die verwendete Methodik der Protoplastentransformation ist z.B. in der Österreichischen Patentschrift AT 391 481 beschrieben (siehe dort insbesondere Beispiele 6, 8, 10 und 12) und beinhaltet die Generierung einer Nitratreduktase-Mutante, Transformation derselben und anschließend eine Selektion von Transformanten auf nitrathaltigem Nähragar. Die

14

Eigenschaften des für diese Selektion eingesetzten niaD Gens sind ebenfalls in der angegebenen Referenz beschrieben.

Es wird eine Protoplastendichte von 10^8 /ml in KCM-Puffer (0,7 M KCl/ 50 mM CaCl₂/ 10 mM MOPS/ pH5,8) eingestellt. Zu 100 µl dieser Suspension werden die Aliquots der DNA-Lösungen der einzutransformierenden DNA-Fragmente gegeben, wobei das zugegebene Volumen 10 µl beträgt. Das Verhältnis der beiden Fragmente wird etwa im molaren Verhältnis 1-1,5 zu 1 gewählt, kann aber natürlich auch in einem anderen Verhältnis zugegeben werden. Pro Transformationsansatz werden ca. 1,5 – 3,5 µg des ca. 4,5 kb großen EcoRI/XbaI Fragmentes (umfassend das niaD Gen) und ca. 0,8 – 1,8 µg des ca. 3,2 kb großen SalI Fragmentes aus Beispiel 1 (umfassend das erfindungsgemäße Gen) zugegeben. Anschließend werden 50 µl PEG- (Polyethylenglycol-) Lösung (50 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH7,5, 20 % PEG) zugesetzt, gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Weiterhin werden 0,5 ml PEG Lösung (s.o.) zugegeben, vorsichtig durch Drehen des Röhrchens gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nachfolgend werden 1,5 ml KCM-Puffer zugegeben und wiederum vorsichtig gemischt. Schließlich werden jeweils etwa die Hälfte des Transformationsansatzes mit 7 ml R1 Weichagar gemischt und auf dem Selektionsagar R1 ausgegossen (siehe auch Österreichische Patentschrift AT 391 481). Nach Inkubation der Agarplatten für etwa zwei Wochen bei 25 °C waren die Kolonien der Transformanten gut angewachsen und konnten weiter verwendet werden.

Transformanten aus solchen Experimenten werden beispielsweise mittels Southern-Hybridisierung auf Anwesenheit von zusätzlich integrierten Kopien des erfindungsgemäßen Gens, bzw. des verwendeten essentiellen Teils von Plasmid1 getestet.

Beispiel 4: Produktion von Penicillin

In Beispiel 3 erzeugte Transformanten werden in Kolbenfermentationsversuchen auf Penicillin-Produktion getestet. Sinnvollerweise wird parallel je eine etwa gleich große Population von ca. 500 – 1000 Co-Transformanten und Transformanten verglichen. Hierzu werden Überstände dieser Kolbenfermentationen mittels HPLC-Analytik evaluiert.

Ein entsprechendes Verfahren für Penicillin G oder V, je nachdem, ob als Precursor Phenylacetat oder Phenoxyacetat zugegeben wurde, ist zum Beispiel beschrieben in: C.S.

15

Ho et al., „Enhancing Penicillin Fermentations by Increased Oxygen Solubility Through the Addition of n-Hexadecane“, Biotechnology and Bioengineering 36 (1990), S. 1110 – 1118.

Die Penicillin-Titer in den Kolbenfermentationen können mittels HPLC-Analytik bestimmt werden, etwa wie in L.H. Christensen et al., "A robust liquid chromatographic method for measurement of medium components during penicillin fermentations", Analytica Chimica Acta 296 (1994), S. 51 - 62, angegeben.

Um statistisch relevante Datenmengen zu erhalten, werden diese Analysen mehrfach (z.B. 6 Mal) wiederholt, wobei bei jeder Wiederholung jeweils von jedem Stamm mehrere (z.B. 4) parallele Kolbenfermentationen durchgeführt und einzeln getestet werden. Auf diese Weise werden, ausgehend vom P. chrysogenum-Stamm PC-180060, drei Stämme identifiziert (PC-20494, PC-20495 und PC-20496) die aus der Co-Transformation mit dem erfindungsgemäßen pptA Gen stammen und eine deutlich höhere Penicillin-Produktivität als der Ausgangsstamm aufweisen. Solche Stämme können für Produktionszwecke für Penicilline, insbesondere Penicillin G oder Penicilin V, im industriellen Massstab verwendet werden.

Das von den transformierten Stämmen produzierte Penicillin wird nach publizierten Standardverfahren aus dem Fermentationsbrei extrahiert und aufgereinigt (z.B. gemäss A.H. Rose (Ed.), Secondary Products of Metabolism, Academic Press London, 1978, Seite 75 – 86).

16

Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäure-Molekül, das für ein Protein kodiert, das die Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NR 1 umfasst.
2. Nukleinsäure-Molekül gemäss Anspruch 1, das für ein Protein kodiert, das ausschliesslich die Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NR 1 aufweist.
3. Nukleinsäure-Molekül gemäss einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei das Nukleinsäure-Molekül ein DNA-Molekül ist.
4. Nukleinsäure-Molekül gemäss Anspruch 3, umfassend eine Basensequenz gemäss SEQ ID NR 2 oder eine Basensequenz, die sich nur aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz gemäss SEQ ID NO. 2 unterscheidet.
5. Nukleinsäure-Molekül gemäss Anspruch 3, umfassend eine Basensequenz gemäss SEQ ID NR 3 oder eine Basensequenz, die sich nur aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz gemäss SEQ ID NO. 3 unterscheidet.
6. Nukleinsäure-Molekül gemäss Anspruch 3, umfassend eine Basensequenz gemäss SEQ ID NR 4 oder eine Basensequenz, die sich nur aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz gemäss SEQ ID NO. 4 unterscheidet.
7. Nukleinsäure-Molekül gemäss Anspruch 3, das ausschliesslich eine Basensequenz aufweist, die ausgewählt ist aus der Gruppe der Basensequenzen SEQ ID NR 2, SEQ ID NR 3, SEQ ID NR 4 und einer Basensequenz, die sich nur aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von einer der genannten Sequenzen unterscheidet.
8. Vektor, umfassend ein Nukleinsäure-Molekül gemäss einem der Ansprüche 1 bis 7.
9. Vektor gemäss Anspruch 8, wobei der Vektor zur Transformation einer Wirtszelle geeignet ist.
10. Vektor gemäss Anspruch 9, wobei die Wirtszelle ein Mikroorganismus ist.

17

11. Vektor gemäss Anspruch 10, wobei der Mikroorganismus ein filamentöser Pilz ist.
12. Vektor gemäss Anspruch 11, wobei der filamentöse Pilz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium citrinum*, *Acremonium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* und *Tolypocladium inflatum*.
13. Vektor gemäss Anspruch 12, wobei der filamentöse Pilz *Penicillium chrysogenum* ist.
14. Wirtszelle, die mit Nukleinsäure-Molekül gemäss einem der Ansprüche 1 bis 7 oder mit einem Vektor gemäss einem der Ansprüche 8 bis 13 transformiert ist.
15. Wirtszelle gemäss Anspruch 14, wobei die Wirtszelle ein Mikroorganismus ist.
16. Wirtszelle gemäss Anspruch 15, wobei der Mikroorganismus ein filamentöser Pilz ist.
17. Wirtszelle gemäss Anspruch 16, wobei der filamentöse Pilz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium citrinum*, *Acremonium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* und *Tolypocladium inflatum*.
18. Wirtszelle gemäss Anspruch 17, wobei der filamentöse Pilz *Penicillium chrysogenum* ist.
19. Verfahren zur Herstellung von Penicillin, umfassend die Kultivierung einer Wirtszelle gemäss Anspruch 18 unter Bedingungen, die geeignet sind, die Bildung von Penicillin durch die Wirtszelle zu bewirken.
20. Verfahren gemäss Anspruch 19, wobei das Penicillin Penicillin G oder Penicillin V ist.
21. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 19 oder 20, weiterhin umfassend die Isolierung des gebildeten Penicillins.
22. Isoliertes Protein, umfassend eine Aminosäuresequenz gemäss SEQ ID NR 1.

18

23. Protein gemäss Anspruch 22, wobei das Protein ausschliesslich die Aminosäuresequenz
gemäss SEQ ID NR 1 aufweist.

19

Figur 1 (SEQ ID NR 1): Aminosäuresequenz des von dem erfindungsgemässen Nukleinsäure-Molekül kodierten Proteins PPTA aus *P. chrysogenum* (dargestellt vom N-Terminus zum C-Terminus)

1 MVDPSVSGIT KMDTNDIKQN DIPKDQPTLV RWYMDVRRWD EKYFDLPLLE
51 TLTQPDQAAV KKYYQTSDKR LSLASQLLK YIHQATGTP WSKIEIQRTP
101 MPENRPFYDS SLDFNVSHQA GLTLFAGTRA ATAHSLSGGP QTLPRVGIDV
151 ACVDEPSRRR ANRPPKTLAD LATFVDVFSD VLSLRELATI KNPYATLKL
201 RELGLNKSDP SKDDQEVLAA YGIRLFYSIW ALKEAYLKMT GDGLLASWI
251 DLEFTNVVPP EPVQTVGFAG DPSATHAPSV QNWGRPYSDV KISLRGIPDH
301 SVRVQPVGFE SDYIVATAAS GPNIGSVSRQ VVVNDSDHHL PGRITAFDSE
351 TGLQNVRIIPP IALRSIGDGD PWRVDSKISD PWLPMQEVDI EIDIRPCADG
401 RCEHLRDILPS F

20

Figur 2 (SEQ ID NR 2): Genomische DNA-Sequenz des kodierenden Bereichs des pptA Gens aus P. chrysogenum vom Translations-Start-Codon (ATG) bis zum Translations-Stop-Codon (TAA). Das Intron ist unterstrichen dargestellt. Dargestellt ist ein Einzelstrang von 5'- in 3'- Richtung.

```

1 atggtagacc ccagtgtgtc tggaattgtg agtagccaca tagcctccat
51 gagtgcaccc actgaccaat ttcagaccaa aatggatacc aatgatatca
101 aacagaatga catccccaa gaccagccca cggttgtccg atggtacatg
151 gatgtcagac gttggatga aaaatactt gatctccctt tgcttcaa
201 cttaacacag cctgatcagg cagctgtcaa gaagtactat caaacatcg
251 acaagcgcc tcccttgccc tccagttgc taaaatatta ctacattcac
301 caagccactg gcactccctg gagcaagatt gagatccagc gtactccgat
351 gcccggaaat cgaccattt acgattcaag cctggatttc aacgtcagcc
401 atcaggctgg ttcactctg ttgcaggca cgctgtccgc aacagccac
451 tccttatccg gtggacctca aacattgcct cgctgtggaa ttgacgttgc
501 gtgtgttgc gaaaccttc gtcgtcgtgc taatcgccc ccgaagacac
551 ttgccgacct tcaacacctc gtggatgtct tcagtgcgt tctctcactc
601 cgtgagcttgc gacccatcaa gaaccgtac gcgcacttta aattggctcg
651 tgagcttgcgtt ctgaaaaaa gtgacccgag caaagacgac caggaagtcc
701 ttgctgccta cgccatttgg ctgttctact cgattggc tctcaaggag
751 gcttacttga aaatgaccgg agacggcctt ctggcctt ggataaagga
801 tctggattc acaaacgttgc ttccccccga accagtccaa acagtccggat
851 ttgctgttgc tccttctgcc actcacgcgc cctcggtcca aaattgggc
901 cggccttact cccatgttca aatctccttgc cgtggcattc ctgaccattc
951 tgtgcgcgtt cagctcgatc gcttcgagtc cgactacata gttgcacgg
1001 cccgcgttgcggg ccccaatatt ggtccgtt cgcggcagg agtcgtaat
1051 gacagcgatc accatctgcc agggcgtatc acaggcttcg actctgagac
1101 tggactccag aacgtccgca ttcccccaat cgcgcttcga tcaattggcg
1151 atggggaccc ctggcgttgc gactcgaaaaa tcagcgaccc ctggctcccc
1201 atgcaggagg tcgatattga aatcgatatc cggccctgtg cggatggcgt
1251 ttgcgagcac ctacggatt taccaaat ttaa

```

21

Figur 3 (SEQ ID NR 3): cDNA-Sequenz des kodierenden Bereichs des pptA Gens aus *P. chrysogenum* vom Translations-Start-Codon (ATG) bis zum Translations-Stopp- Codon (TAA); dargestellt ist ein Einzelstrang von 5'- in 3'-Richtung.

1 atggtagacc ccagtgtgtc tggaaattacc aaaatggata ccaatgatat
51 caaacagaat gacatccccca aggaccagcc cacgttggtc cgatggtaca
101 tggatgtcag acgttggat gaaaaatact ttgatctccc ttgcgttgaa
151 accttaaacac agcctgatca ggcagctgtc aagaagtact atcaaacatc
201 ggacaaggcgc ctgtccttgg cctcccgatt gctgaaaatat tactacattc
251 accaagccac tggcactccc tggagcaaga ttgagatcca gcgtactccg
301 atgcccggaaa atcgaccatt ctacgattca agcctggatt tcaacgtcag
351 ccatcaggct ggtctcactc tggtcgcagg cacgcgtgcc gcaacagccc
401 actccttatac cggtggacct caaacattgc ctcgcgtggg aattgacgtt
451 gcgtgtgttg atgaaccctc tcgtcgtcgt gctaatcgtc ccccgaaagac
501 acttggcgac cttgcaacct tcgtggatgt cttcagtgac gttctctcac
551 tccgtgagct tgccgaccatc aagaacccgt acgcgactct taaattggct
601 cgtgagcttg gtctgaataa aagtgaccgg agcaaagacg accaggaagt
651 ctttgcgtgcc tacggcattc ggctgttcta ctcgatttgg gctctcaagg
701 aggcttactt gaaaatgacc ggagacggcc ttctggctc ttggataaag
751 gatctggaat tcacaaaacgt tttcccccc gaaccagttc aaacagtccg
801 atttgcgttgt gatccttctg ccactcacgc gocctcggtc caaaattggg
851 gccggcctta ctccgatgtc aaaatctct tcgtggcat tcctgaccat
901 tctgtgcgcg ttccagccctg cgcttcgag tccgactaca tagttgccac
951 ggcccggtcg ggccccaaata ttggatccgt ttgcggcag gtagtcgtga
1001 atgacagcga tcaccatctg ccagggcgtt tcacagcctt cgactctgag
1051 actggactcc agaacgtccg cattccccca atcgcgttcc gatcaattgg
1101 cgatggggac ccctggcggtg tggactcgaa aatcagcgcac ccctggctcc
1151 ccatgcagga ggtcgatatt gaaatcgata tccggccctg tgccggatgg
1201 cgttgcgcgc acctacqqa tttaccaaqc ttttaa

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

**Figur 4 (SEQ ID NR 4): Genomische DNA-Sequenz eines Sall-Fragments eines
genomischen Klons des pptA Gens (dargestellt ist ein Einzelstrang von 5'- in 3'-Richtung).
Das Translations-Start-Codon (ATG) sowie das Translations-Stopp-Codon (TAA) des
kodierenden Bereichs sind unterstrichen und fettgedruckt dargestellt; das Intron ist
unterstrichen dargestellt.**

```

1  gtcgaccgaa gtggttcgg ttcactcgca catcaagacc accgatcagc
51  tcttgcgcgc ccttctttgt cttgttggca gactcgccaa gcaaaatgag
101  cccggcgcat gtacccccacg tcgggttgcg atccactctg cataaccac
151  gtatttagatc gaattgatat ggactaaccc ggtaactca ctttacgaat
201  tctcgcaagt gctcgagaag atttgacctt gctgcgacta aagacatagt
251  ggtactctcg cctccgggca agaccaggcc gtcgcattttt gccagtttctt
301  gtggcgatccg tacttcaatg aagtgcattt ccgacggctg cgcttgcata
351  gcggcctttt tcaaaaagctg cacatgctca aagaatgcgc cctgttagggc
401  caggactcca acagtgatag ccatttcctc tgaagatcgg aattgcggac
451  cctccgagct cgggtgcattt ttgatattga tgacttttt taaagcacat
501  gactttgact ttccggcggg gaacgtatca acacgtgatg gcggcttatac
551  tccatcttta. attccacgcg acatcaggat atcgtgagag ctctcgacg
601  attcctgcgc actttgaaaaa cagactgcac aaccgaggca ttatagtata
651  aaacaaatag actcacctac agaaagagtg ataagtttagg tcctataacct
701  gtttccaatg ttctctctc ttgctggatc agctttaaca tatctatgga
751  tggtatcttgc gatagtatca gtcattttgc gcttgcattt gcatgtctct
801  ttgctacatc ctatttatgg tattatgtac acggcctgtt tctcgttgc
851  cggccttatttgc atgtatcat gttttgtgtt aggtatgtt tgcctcgct
901  tatacgacacg tgctgataga taaggacccc gataagacgc caacatggct
951  tctatccagg tgtggatgtt ccgcattccaa ggtgcata tacgagatca
1001  caatgcaatg gtagacccca gtgtgtctgg aattgtgatg agccacatag
1051  cctccatgag tgcacccact gaccaatttc agacccaaat ggataccaaat
1101  gatataaaac agaatgacat ccccaaggac cagccacgt tggccgatg
1151  gtacatggat gtcagacgtt gggatgaaaa atactttgtat ctccctttgc
1201  ttgaaacctt aacacagcct gatcaggcag ctgtcaagaa gtactatcaa
1251  acatcgacaca agcgcctgtc cttggcctcc cagttgtca aatattacta
1301  cattcaccaa gccactggca ctcctggag caagattgag atccagcgta
1351  ctccgatgcc cggaaatcga ccattctacg attcaagcct ggatttcaac
1401  gtcagccatc aggctggctc cactctgttc gcaggcacgc gtgccgcaac
1451  agcccactcc ttatccggtg gacctaaccat attgcctcgcc gtggaaattg
1501  acgttgcgtg ttttgcgttcc cccctctgtc gtcgtgctaa tcgtcccccg
1551  aagacacttg cgcacccgttcc aactttcgat gatgtctca gtgacgttct
1601  ctcactccgt gagcttgcgttcc ccatcaagaa cccgtacgcg actcttaat
1651  tggctcgttcc gcttggctgttcc aataaaaatg acggcggacaa agacgaccag
1701  gaagtcccttgc ctgccttacgg cattcggcttcc ttctacttgc tttgggtct
1751  .caaggaggcttacttgcggaaa tgacccggaga cggcccttgc gcctcttggaa
1801  taaaggatct ggaattcaca aacgttgcgttcc ccccgaaacc agttcaaaaca
1851  gtcggatttg ctgggtatcc ttctggccact cacgcggccct cggtcggaaa
1901  ttggggccgg ccttacttgcg atgtcaaaat ctccttgcgttcc ggcattcctg
1951  accattctgt ggcgcgttcc gtcgtcggct tcgagtccga ctacatagtt
2001  ggcacggccg cgtcgccccc caatattggaa tccgttgcgttcc ggcaggtagt
2051  cgtgaatgac agcgatcacc atctggcagg gctgtatcaca gccttcgact
2101  ctgagactgg actcccgaaac gtcgcatttcc ccccaatcgc gcttcgatca
2151  attggcgatg gggacccctg gctgtggac tcgaaaatca gcgacccctg

```

23

2201 gctccccatg caggaggctg atattgaaat cgatatccgg ccctgtgcgg
2251 atggtcgttg cgagcaccta cgggatttac caagctttaattccttct
2301 tgctggata tgaccaggcg accatgcacc cgagttattt gcatattgca
2351 tctcctcatc tcattttcct ttctgagcgt gtttttcgga gcgataatta
2401 cccttgaaca tatttctgca ttgctgtatt gccatttagcg aaaattcccg
2451 agcttagttgt agttgatttc ctggAACGCT gggggagtgc cgctcagatg
2501 ttcatctcca ataagcccct caatgaatct tcacttcattc ggatccaagg
2551 tcaatcttcg agatcaagtg caagttgcc agaaagcacg ggtaaagaaa
2601 ccaaggcttat ttctattcta tggcttaatg taaactaaaa atgtagaagg
2651 aagaaaagca agtatccaac agtaggcggg tcatgacatg cgtgtgcgt
2701 aaggatatat acatttcgaa ttgcaaagag ggaagaggtg aatcaggagt
2751 gaaatgtgtg tcaagaggca atgtcaatgt caagatcatt gttgctctca
2801 tgagcagtca cggattgtgt cggattgttc ggcgtctggg gccctcagat
2851 tctatttctg ggtcatgagc ttgagagtag gtaccgaaga agtgagcagt
2901 attatactgc agtgagtgtt tagggggaat tccttctggt gaattgtggc
2951 gttcgggggtt gctctccgggt cttatgggtc ttaatctgga tgcccgtatag
3001 tgcacccaag ttaggagaaa aacatatggt aagtgttaat cgtggagcag
3051 tgtggcgaat cgcgaattgg gtttggcact tagatttgc tgccgtataga
3101 gacgcccgttgc gcgcgagcac catgcaccc attttatgc gcgtgggaca
3151 ttgctgcaag agtttgagc atcgaatccc gcgtcgac

-24°

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäure-Moleküle, die für ein neues Protein aus *Penicillium chrysogenum* kodieren, Vektoren, die eine solches Nukleinsäure-Molekül umfassen, Wirtszellen, die mit einem solchen Nukleinsäure-Molekül oder Vektor transformiert sind, und ein Verfahren zur Herstellung von Penicillin unter Verwendung solcher transformierter Wirtszellen.

Sandoz GmbH

Morris Rosader

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.